

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
UNIDADE ACADEMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE - UNASAU**

CURSO DE FARMÁCIA

SILVIA REGINA ALVES DE MEIRA

**AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA EM
RATOS WISTAR JOVENS SUBMETIDOS A MENINGITE PNEUMOCÓCICA**

**CRICIÚMA, JUNHO DE 2011.
SILVIA REGINA ALVES DE MEIRA**

**AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA EM
RATOS WISTAR JOVENS SUBMETIDOS A MENINGITE PNEUMOCÓCICA**

Artigo de Conclusão de Curso, apresentado para obtenção do grau de farmacêutico generalista no Curso de Farmácia da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Tatiana Barichello

CRICIÚMA, JUNHO DE 2011.
SILVIA REGINA ALVES DE MEIRA

**AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DA BARREIRA
HEMATOENCEFÁLICA EM RATOS WISTAR JOVENS SUBMETIDOS
A MENINGITE PNEUMOCÓCICA**

Artigo aprovado pela Banca Examinadora para
obtenção do Grau de Farmacêutico Generalista, no
Curso de Farmácia, da Universidade do Extremo Sul
Catarinense, Unesc.

Criciúma, 21 de Junho de 2011.

BANCA EXAMINADORA

PROF.^(a) Tatiana Barichello -(doutora) - orientadora

Prof.^(a) .Paulo Roberto Barbosa –(mestre) – (Unesc)

Prof.^(a) .Cleonice Maria Michelon –(mestre) – (Unesc)

DEDICATÓRIA

Dedico esta conquista a minha família, que é minha base e exemplo de vida, e sempre estiveram ao meu lado incentivando-me e dando-me força para vencer mais esta etapa da minha vida, e em especial, a meu esposo Renato, que soube esperar, entender, compreender e que me ajudou nos momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a *Deus*, por nunca me abandonar, por sempre guiar meus passos, iluminar meus pensamentos, me abençoar e me dar forças para alcançar mais esse sonho em minha vida.

Agradeço muito aos meus pais amados, *Romário* e *Geni*, e meus irmãos *Andréa*, *Romário Jr.* e *Juliano*, pois sempre me incentivaram, apoiaram e me deram coragem em todos os momentos da minha vida, agradeço pelo imenso carinho, atenção e pelo enorme amor que sempre me dedicaram. Ao longo do curso e realização do trabalho, agradeço pela paciência e dedicação.

A meu esposo *Renato*, agradeço pelo amor, carinho e apoio no decorrer deste trabalho, agradeço também pela compreensão e ajuda nas horas que mais precisei.

Agradeço também aos meus sogros *Luiz* e *Nelita*, pelos conselhos e apoio que me dedicaram nesta jornada.

A minha orientadora *Tatiana Barichello*, agradeço pela enorme paciência, atenção e dedicação durante todo o trabalho.

Agradeço aos *Mestres* pelos conhecimentos a mim transmitidos durante todo o curso e pela contribuição para minha formação acadêmica.

“Para ter um negócio de sucesso, alguém, um dia, teve que tomar uma atitude de coragem.”

(Peter Drucker)

RESUMO

Avaliação da integridade da barreira hematoencefálica em ratos Wistar jovens submetido a meningite pneumocócica

A meningite bacteriana é uma inflamação das meninges e do espaço subaracnóideo que ocorre em resposta as bactérias. As crianças são particularmente vulneráveis a meningite bacteriana, dois terços das mortes de meningite em países de baixa renda ocorrem entre crianças menores de 15 anos. Os principais agentes patogênicos bacterianos causando meningite para além do período neonatal são *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* tipo b e *Neisseria meningitidis*. Objetivo avaliar a integridade da barreira hematoencefálica de ratos jovens submetido a meningite pneumocócica. Os animais foram submetidos a inoculação cisterna magna de Salina estéril como placebo ou uma quantidade equivalente de uma suspensão de *s. pneumoniae* na concentração 1×10^6 UFC/mL. Os animais foram mortos em diferentes momentos após a indução. O cérebro foi removido e o hipocampo e córtex foram isolados e utilizados para a determinação do rompimento da barreira hematoencefálica. No hipocampo dos animais neonatos, o rompimento aconteceu entre as horas 12 e 18 as após a indução de meningite pneumocócica. No córtex dos animais infantis o rompimento se deu em 18h, até 24 horas. Conclusão: o rompimento da barreira hematoencefálica tanto em animais neonato e jovens ocorreu nas primeiras horas após a infecção, desta torna-se necessário o diagnóstico eficaz e o início da antibioticoterapia para reverter possíveis danos.

Palavras-chave: Meningite; *Streptococcus pneumoniae*.

LISTAS DE ABREVIATURAS

BHE - Barreira Hematoencefálica
DNA- Ácido desoxirribonucléico
LCR - Líquido Cefalorraquidiano
MBA - Meningite Bacteriana Aguda
MMPs - Metaloproteinases
PMN - Polimorfonucleares
SN – Sistema Nervoso
SNC - Sistema Nervoso Central
SNP - Sistema Nervoso Periférico
SFKs – Src. Família cinases

SUMÁRIO DE FIGURAS

Figura 01: Barreira Hematoencefálica.....	13
Figura 02: Mecanismos envolvidos na passagem microbiana da barreira blood – brain	14
Figura 03: Junção celular	14
Figura 04: Passagem celular.....	15
Figura 05: Hipocampo e córtex de ratos neonatos.....	24
Figura 06: Hipocampo e córtex de ratos infantis	25

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 Meninges.....	10
1.2 Barreira hematoencefálica	12
1.3 Meningite.....	15
1.3.1 Meningite aguda	15
1.3.2 Meningite crônica	16
1.4 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	16
1.4.1 Características	16
1.4.2 Doença	17
1.4.3 Colonização e passagem pela barreira hematoencefálica	17
1.4.4 Mecanismo de patogenicidade	18
2 OBJETIVOS.....	20
2.1 Objetivo Geral	20
2.2 Objetivos Específicos	20
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1 Local de realização da pesquisa	21
3.2 Critério de exclusão, suspensão ou encerramento da pesquisa	21
3.3 Cálculo do tamanho da amostra.....	21
3.4 Modelo animal	21
3.5 Protocolo para indução de meningite	22
3.6 Permeabilidade da barreira hematoencefálica por azul de evans	22
3.7 Análises estatísticas	23
4 RESULTADOS.....	24
4.1 Hipocampo e córtex de ratos neonatos	24
4.2 Hipocampo e córtex de ratos Infantis	25
4.3 Discussão.....	25
CONCLUSÃO	27
REFERÊNCIAS.....	28

1 INTRODUÇÃO

O corpo possui um centro de controle de resposta rápida, o sistema nervoso (SN) o qual tem duas divisões, o sistema nervoso central (SNC) e o sistema nervoso periférico (SNP) (TORTORA, 2000).

Dentro do SNC, diversos tipos de informações sensitivas são integradas e correlacionados, pensamentos e emoções são gerados, memória é formada e armazenada. A maioria dos impulsos nervosos que estimulam a contração muscular e a secreção glandular origina-se no SNC (TORTORA, 2000).

O SNC consiste do encéfalo e da medula espinal. O encéfalo na cavidade craniana e a medula espinal, na cavidade vertebral (TORTORA, 1988). O encéfalo é composto de aproximadamente 100 bilhões de neurônios e 1 trilhão de neuroglias. Ele é um dos maiores órgãos do corpo, pesando cerca de 1.300g. (TORTORA, 2000). O encéfalo ainda apresenta três importantes divisões: cérebro, cerebelo e tronco encefálico. No cérebro, encontramos uma subdivisão, que é composto por telencéfalo e diencefalo. No cerebelo, como no cérebro, também encontramos divisões anatômicas importantes que são o córtex, núcleos profundos e diencefalo. A última das divisões do encéfalo é o tronco encefálico que por sua vez está subdividido em: mesencéfalo, ponte e bulbo (LENT, 2008). Acima do tronco do encéfalo está o diencefalo, consistindo principalmente do tálamo e do hipotálamo (TORTORA, 2000).

1.1 Meninges

As meninges são revestimentos contínuos de tecido conjuntivo em torno da medula espinal e do encéfalo. Elas são denominadas respectivamente, meninges espinhais e meninges encefálicas (TORTORA, 2000). As meninges são formadas por três membranas que envolvem o neuro-eixo responsável por fornecer proteção ao encéfalo e medula espinal. Posicionadas anatomicamente dentro da caixa craniana e medula espinal. De fora para dentro as meninges são dispostas em: dura-máter, aracnóide e pia-máter (BURT, 1995).

A meninge mais externa é denominada dura-máter (TORTORA, 2000). A primeira membrana de fora para dentro, a dura-máter é composta por tecido fibroso espesso e consiste na maior parte de fibras colágenas e fibrosas, formando um saco

resistente e inelástico que envolve o encéfalo e a medula espinhal, sendo assim, como todo tecido conjuntivo a dura-máter é rica em fibroblastos. Onde essas células produzem uma grande quantidade de colágeno que as torna rígida e resistente. É vascularizada e inervada; como o encéfalo não possui terminações nervosas sensitivas, toda ou quase toda a sensibilidade intracraniana se localiza na dura-máter, responsável pela maioria das dores de cabeça, apresentando-se em duas camadas, onde a camada mais externa está firmemente aderida aos ossos cranianos com seu periósteo. A camada interna da dura-máter, com menor espessura, volta-se para dentro em certos lados para tornar divisões na área do encéfalo (LENT, 2005)

A meninge média é denominada aracnóide, devido ao seu delicado arranjo em forma de teia de aranha, de fibras colágenas e elásticas, mas sua consistência é menos rígida do que a da dura-máter. A segunda membrana, a aracnóide, é composta por uma membrana serosa e frágil, formando uma espécie de amortecedor do encéfalo. A aracnóide é avascular, tendo em vista que os vasos que nutrem o encéfalo e a medula correm na pia-máter aderida intimamente ao tecido nervoso e acompanham todas as suas saliências e depressões (BURT, 1995).

A meninge mais interna é a pia-máter, uma membrana transparente de fibras colágenas e elásticas que adere a superfície da medula e do encéfalo. Ela contém numerosos vasos sanguíneos é também a mais fina e delicada das meninges, acompanhando todas as saliências, depressões e fissuras maiores do cerebelo, ligando ao epêndima onde falta tecido nervoso para separá-los, forma a tela coróidea de cada ventrículo e seus plexos coróides. Entre a aracnóide e a pia-máter está a cavidade subaracnóide, onde circula o LCR (TORTORA, 2000).

A dura-máter e a aracnóide aderente ao espaço subaracnóide seguem o contorno do calvário, enquanto a pia-máter segue o contorno do encéfalo. Como resultado, o espaço subaracnóide não é uniforme. As áreas onde esse espaço subaracnóide está aumentando são chamadas de cisternas subaracnóides sendo, a maior delas a cisterna magna (BURT, 1995). Ocupa o espaço entre a face inferior do cérebro e a face dorsal do bulbo o tecto do IV ventrículo (MACHADO; CAMPOS, 2004).

1.2 Barreira Hematoencefálica

BHE como o encéfalo é o principal centro de controle do corpo, suas células devem estar protegidas de substâncias potencialmente perigosas presentes no sangue. Os capilares no encéfalo são muito menos permeáveis que a maioria dos capilares do corpo, e eles excluem muitas moléculas que atravessam os outros vasos capilares, sendo que, as células endoteliais que formam as paredes dos capilares encefálicos são as mesmas que as dos outros capilares, mas, a baixa permeabilidade dos capilares é pela maneira pela qual as células endoteliais destes se unem umas às outras. Estas são ligadas pelas chamadas junções fechadas, isto é, as membranas das células endoteliais adjacentes estão intimamente fundidas umas às outras (SILVERTHORN, 2003).

A BHE (Figura 1) é uma barreira estrutural e funcional que é formada por células endoteliais microvascular do cérebro, astrócitos e pericitos. Ela mantém a neural eventualidades, regulando a passagem de moléculas dentro e fora do cérebro e protege o cérebro de qualquer microrganismos e toxinas que estão circulando no sangue. Células endoteliais microvascular cérebro têm características distintivas, tais como junções apertadas e baixas taxas de Pinocitose (KIM, 2008).

Existem quatro meios de passagem de substâncias pela barreira:

1. difusão livre que só é possível para substâncias lipossolúveis;
2. transporte mediado por receptores a favor do gradiente de concentração;
3. transporte mediado por receptores contra o gradiente de concentração;
4. passagem por canais iônicos, que permitem a passagem de diferentes íons, (LENT, 2005).

Pode-se dizer que entre as funções da BHE estão: (1) garantir o equilíbrio iônico do compartimento intersticial do tecido nervoso, (2) medir a entrada controlada de substâncias de importância fisiológica, (3) possibilitar a saída de substância que se acumulem no tecido nervoso com potencial de risco de neurotoxicidade. Além disso, recentemente se revelou uma quarta função da barreira, que é a de metabolizar as amins circulantes, inativando-as para que não penetrem no tecido nervoso e interfiram com a transmissão sináptica (LENT, 2005).

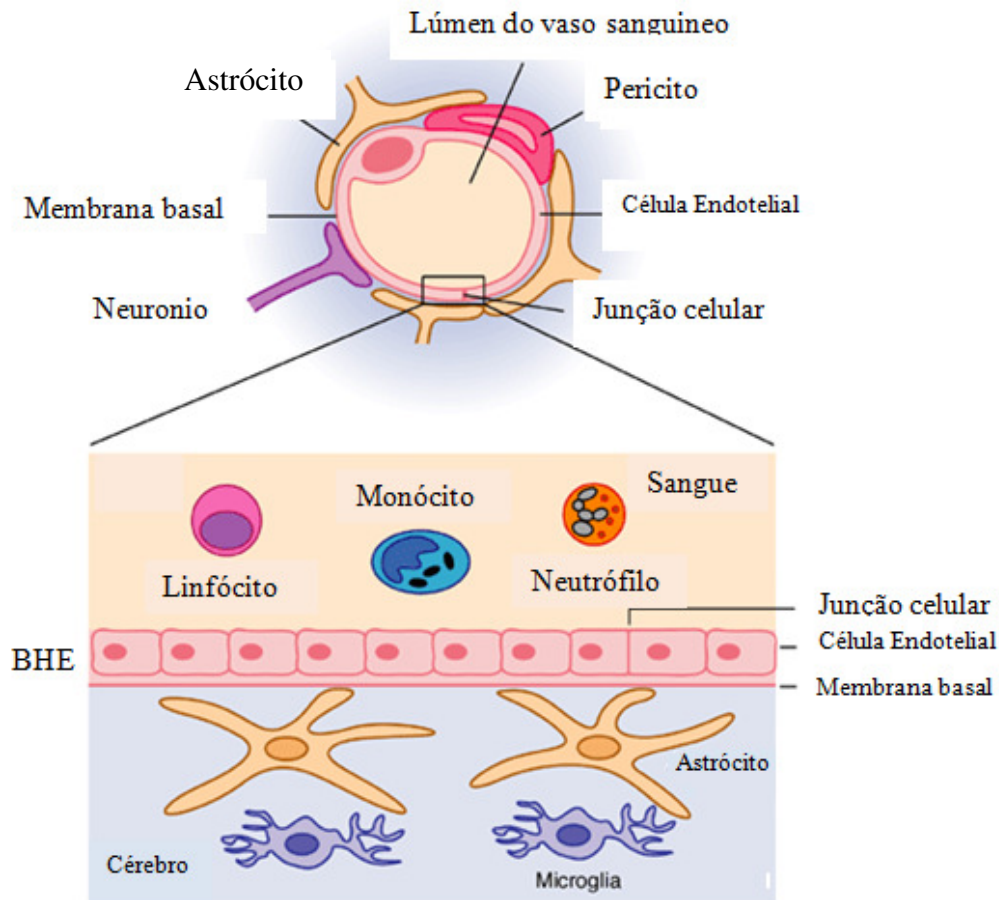


Figura 01: Barreira Hematoencefálica, adaptado de Kim, 2008

Agentes patogênicos podem atravessar a BHE através dos mecanismos transcelular, paracelular ou pelo mecanismo de cavalo de tróia (Figura 2). A travessia transcelular refere-se a penetração microbiana através de células de barreira sem qualquer evidência de microrganismos entre as células ou de interrupção das junções intercelulares. A travessia paracelular é definida como microbiana penetração entre as células da barreira com e/ou sem evidência de interrupção das junções. O mecanismo de cavalo de tróia envolve penetração microbiana das células da barreira usando transmigração dentro os fagócitos infectados (KIM, 2008).

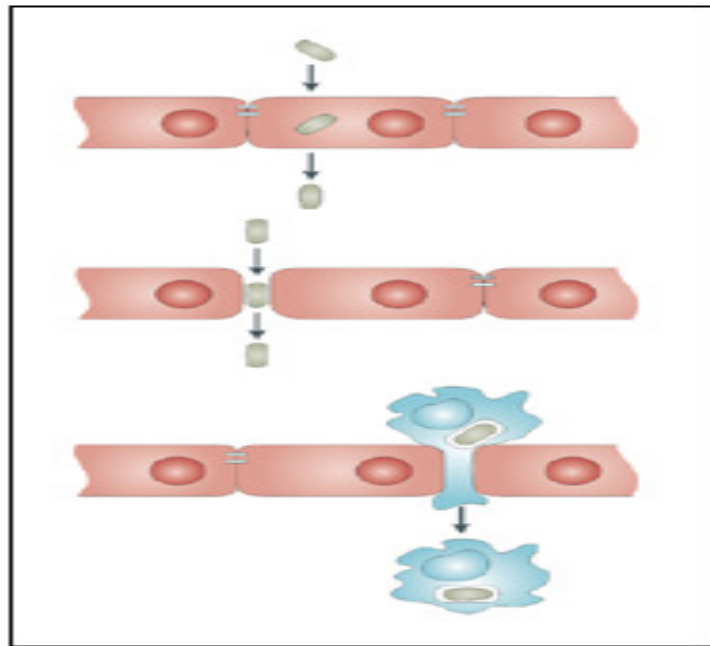


Figura 02: Mecanismos envolvidos na passagem microbiana da BHE adaptado de (Kim, 2008).

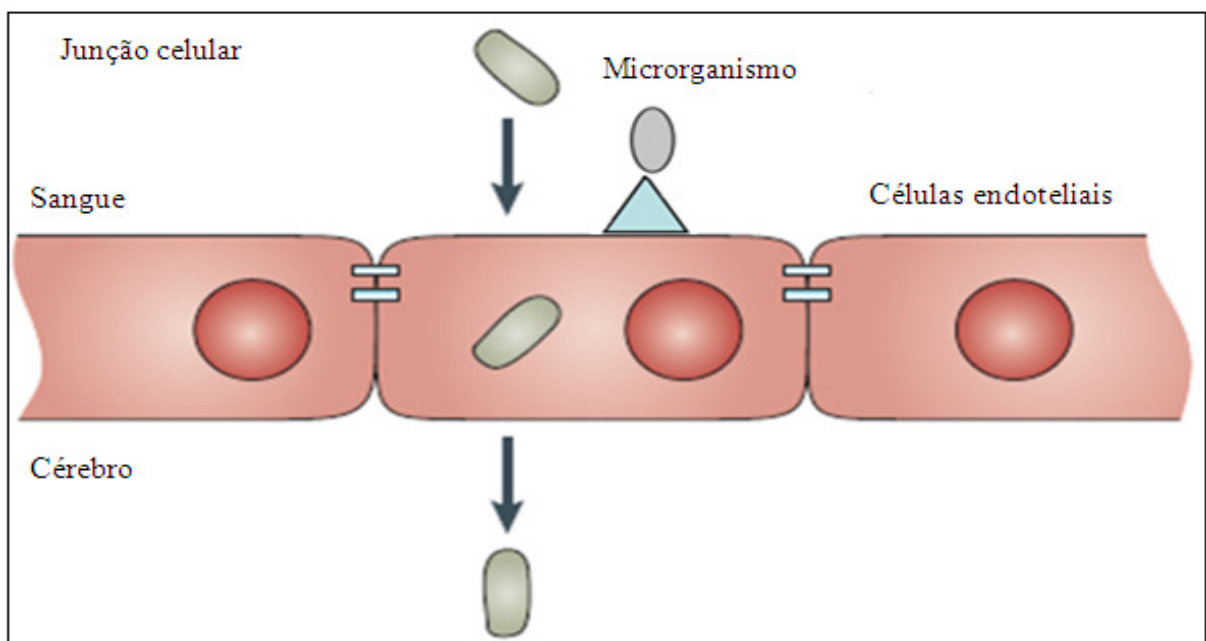


Figura 03: Junção celular, adaptado de Kim 2008.

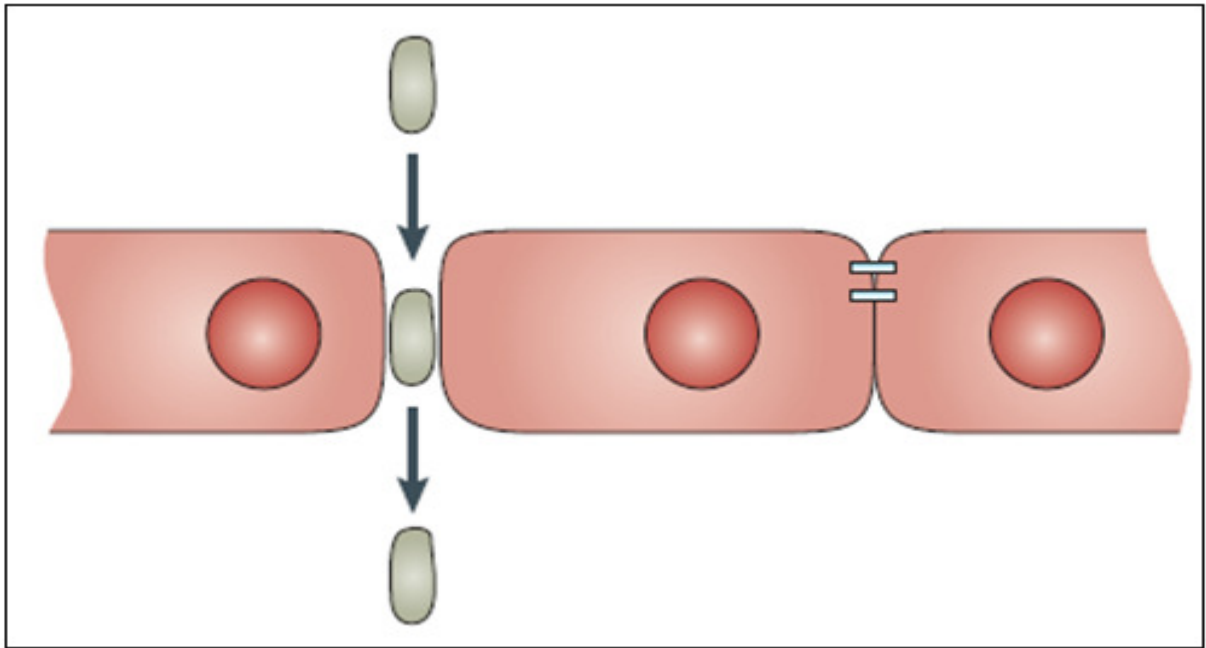


Figura 04: Passagem celular, adaptado de Kim 2008.

1.3 Meningite

Meningite é um processo inflamatório das membranas leptomeníngeas (pia-aracnóide que envolvem o espaço subaracnóide) que envolvem o encéfalo e a medula espinhal. A infecção pode atingir, por contigüidade, estruturas do sistema nervoso central (VERONESI; FOCACCIA, 2005).

A meningite gera complexos cerebrais causando prejuízos neuropsicológicos e cognitivos. Através de uma reação inflamatória e apoptose, independente do organismo patogênico (IRAZUZTA et al, 2005).

Cérebro Os casos são divididos em meningites agudas, subagudas e crônicas, de acordo com a rapidez com que se desenvolve o processo inflamatório. Esta rapidez está relacionada com a natureza do microorganismo infeccioso (MILLER; JUBLET, 2002).

1.3.1 Meningite aguda

A Meningite bacteriana aguda (MBA) é um processo inflamatório que envolve a aracnóide, a pia-máter, e o LCR como resultado da inflamação do SNC por bactérias. Sendo que, inúmeros microrganismos podem causar MBA, e a maioria dos pacientes apresenta febre, cefaléia contínua e rebelde à medicação analgésica,

inquietação, agitação, confusão mental, delírio ou torpor, constipação intestinal, hipertrofia muscular caracterizada, sobretudo pela rigidez de nuca, sinais oculares (estrabismos, midríase, etc.), mialgia de início súbito (menos de 24 horas), 10 a 20% tem alterações dos pares cranianos, convulsões podem aparecer desde o início do quadro em 15 a 30% dos casos, localizadas ou generalizadas, petéquias podem estar presentes (PRADO *et al*; 2003).

As principais complicações da MB são perda da audição, distúrbio de linguagem, retardo mental, anormalidade motora e distúrbios visuais (BRASIL, 2005).

1.3.2 Meningite crônica

A meningite crônica é uma síndrome clínica, causada por agentes infecciosos e não infecciosos, caracterizados pela persistência de sinais e sintomas de meningite, como cefaléia holocraniana, febre, rigidez de nuca, náuseas, vômitos, letargia, com duração superior de quatro semanas, sem melhora (VERONESI e FOCACCIA, 2005).

A meningite crônica corresponde a cerca de 10% de todos os casos de meningite. Pacientes imunossuprimidos apresentam maior desenvolvimento de meningite crônica (IRAZUTA *et al*, 2002).

São inúmeros os agentes das meningites crônicas, incluindo bactérias, vírus, fungos, parasitas, agentes químicos, drogas, neoplasias, doenças metabólicas (como sarcoidose), doenças auto-imunes (lúpus eritematoso). Algumas meningites crônicas podem apresentar um caráter recorrente, tais como: herpes simples, infecções pós-traumática, focos infecciosos parameningeos, meningite induzida por drogas (VERONESI; FOCACCIA, 2005).

1.4 *Streptococcus pneumoniae*

1.4.1 Características

O *S.pneumoniae* é um diplococo gram-positivo, um patógeno frequentemente encontrado em enfermidades infecciosas na comunidade em geral,

sendo o principal agente de pneumonia, meningite, otite média e sinusite ocorrendo em todas as idades (GIL-SETAS *et al*, 2004).

Em meio ágar-sangue produzem α -hemólise, produz exotoxina, hemolisina, toxina que destrói a hemoglobina em um produto de degradação esverdeada. Mais de 98% dos isolados pneumocócicos são suscetíveis à etilhidrocupreína (optoquina) e praticamente todas as colônias são dissolvidas por sais biliares; essas reações constituem a base da identificação laboratorial (LEVINSON; JAWETZ, 2005).

1.4.2 Doença

Os danos neurológicos causados na meningite por *S. pneumoniae* não é apenas infecção nas meninges, mas também comprometimento da vascularização cerebral, edema cerebral, necrose cerebral e hidrocefalia. A infecção pode causar hemorragia intra-craniana como uma das complicações vasculares, em alguns casos, causando meningite encefálica (DAVIS; GREENLEE, 2003).

A mortalidade e a ocorrência de sequelas neurológicas são mais frequentes na meningite pneumocócica quando compara as meningites causadas por outros agentes (PRADO *et al*; 2003).

1.4.3 Colonização e passagem pela barreira hematoencefálica

Os pneumococos colonizam a nasofaringe e se disseminam de um indivíduo para outro por transmissão direta ou por gotículas, ou como resultado de contato íntimo; a transmissão pode aumentar em aglomerações ou ambientes com ventilação precária. O risco de pneumonia pneumocócica não aumenta pelo contato em escolas ou locais de trabalho (HARRISON; BRAUNWALD, 2006).

As infecções pneumocócicas não são consideradas contagiosas porque uma proporção (5-50%) de uma população saudável carrega microrganismos virulentos na orofaringe. A resistência é alta em indivíduos jovens e saudáveis, e a doença resulta mais frequentemente quando fatores de predisposição estão presentes (LEVINSON; JAWETZ, 2005).

A bactéria *S. pneumoniae*, é um dos principais patógenos causadores da MB em termos de mortalidade e morbidade, é uma bactéria que pode ser encontrada como um comensal do trato respiratório superior em humanos, e a colonização assintomática ocorre em até 100% da população normal. A doença invasiva é sucedida pela colonização nasofaríngea, seguida por bacteremia e invasão do SNC (MELI *et al*, 2002).

O *S. pneumoniae* é um microrganismo encapsulado que possui características que o permitem invadir o hospedeiro pelo trato aéreo superior, onde proteínas especializadas conduzem a paralisia dos cílios celulares. O hospedeiro é incapaz de erradicar o microrganismo e este é capaz de invadir a mucosa e ir para a circulação sanguínea. O microrganismo pode então cruzar a BHE e proliferar no SNC, resultando em uma inflamação (SOMAND; MEURER, 2009).

Este patógeno cruza a BHE pelo mecanismo transcelular, pois, ele atravessa sem evidência de dano ou detecção do microrganismo entre as células (KIM, 2008).

1.4.4 Mecanismo de patogenicidade

O principal fator de virulência de *S. pneumoniae* é cápsula de polissacarídeos; que evita que o microrganismo seja fagocitado, opsonizado e morto pelas células fagocitárias do hospedeiro (KONEMAN, 2008).

A resposta inflamatória induzida pela parede celular das bactérias Gram-positivas inclui o recrutamento de leucócitos polimorfonucleares (PMN), mudanças na permeabilidade e perfusão e liberação de citocinas (SILVA, 1999).

Os componentes da parede celular do *S. pneumoniae*, incluindo ácido teicóico, substância C e peptidoglicano, ativam o complemento pela via alternativa; a reação entre as estruturas da parede celular e os anticorpos que estão presentes em todos os seres humanos também ativa a via clássica do complemento (HARRISON; BRAUNWALD, 2006).

A toxina pneumocócica pneumolisina é a mais importante toxina do *S. pneumoniae*. Pertence à família das citolisinas colesterol dependente, esta toxina liga-se ao colesterol das membranas formando grandes poros e destruindo a integridade da membrana ocasionando a morte celular, também possuem efeitos

próinflamatórios que incluem ativação do complemento; ativação de neutrófilos e aumento na produção de TNF- α , IL-1 e óxido nítrico (BRAUN *et al*, 2007).

A aderência inicial do *S. pneumoniae* à mucosa nasofaríngea aparentemente não é mediada pelo material capsular, mas se aderem às células nasofaríngeas humanas por interação específicas de adesinas da superfície bacteriana, como o antígeno de superfície pneumocócica A ou as proteínas de ligação à colina, com os receptores celulares epiteliais. A variação de fase pneumocócica, na qual os microrganismos podem formar colônias transparentes ou opacas, também podem exercer um papel na aderência (KONEMAN, 2008).

Os pneumococos produzem protease IgA, que reforça a habilidade do organismo para colonizar a mucosa do trato respiratório inferior. Não produzem toxinas conhecidas com um papel importante na patogenicidade. Eles produzem protease IgA, o que pode aumentar a capacidade do organismo para colonizar a mucosa do trato respiratório superior (LEVINSON; JAWETZ, 2005).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a integridade da BHE em cérebro de ratos Wistar submetidos à meningite pneumocócica.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar a integridade da BHE em cérebros de ratos jovens submetidos à meningite pneumocócica;

Avaliar a integridade da BHE em cérebros de ratos neonatos submetidos à meningite pneumocócica.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Local de realização da pesquisa

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Microbiologia Experimental, Fisiopatologia Experimental da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC, Criciúma, SC, Brasil, após autorização do comitê de ética da UNESC, Protocolo 55/2010

3.2 Critério de exclusão, suspensão ou encerramento da pesquisa

Os animais ratos Wistar jovens foram excluídos da pesquisa quando apresentaram peso inferior a 15g ou superior a 20g, deficiência visual, motora ou qualquer má formação aparente. Os animais ratos Wistar neonatos foram excluídos da pesquisa quando apresentarem peso inferior a 8g ou superior a 12g, deficiência visual, motora ou qualquer má formação aparente. Correu-se o risco de ter o encerramento da pesquisa, caso ocorresse o sofrimento dos animais.

3.3 Cálculo do tamanho da amostra

Com base em estudos prévios em pacientes e estudos em modelos animais, para uma diferença de até 20% nos parâmetros que foram analisados entre os grupos, com uma variância de no máximo 10% entre as médias calculou-se um tamanho de amostra de 5 animais por grupo, para um erro alfa de 0,05 e um poder de 80%.

3.4 Modelo animal

O modelo foi organizado em 2 grupos experimentais contendo 60 animais em cada grupo, totalizando 120 ratos Wistar neonatos, com 3 a 4 dias de vida. Os experimentos foram realizados em diferentes tempos: grupo meningite - 3 horas, 6 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 30 horas após a indução da meningite, e grupo sham.

3.5 Protocolo para indução da meningite

Foram utilizados ratos Wistar jovens, pesando entre 15 e 20g, com 11 dias de vida, e ratos Wistar neonatos, 3 a 4 dias de vida, pesando 8 a 12g, provindos da colônia de reprodução do biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense, Unesc. Todos os procedimentos cirúrgicos e inoculação da suspensão bacteriana foram realizados sob anestesia, consistindo de uma administração intraperitoneal de cetamina (6,6 mg / kg), xilazina (0,3 mg / kg), (HOOGMAN, 2007; GRANDGIRARD et al, 2007). Os ratos foram submetidos a uma punção na cisterna magna com uma agulha número 23. A posição da agulha foi verificada pelo fluxo livre do líquido cerebral desobstruído. Após a sua recuperação da anestesia, os animais foram alimentados *ad libitum*. A meningite foi confirmada por uma cultura quantitativa de 5µL de líquido cefalorraquidiano, obtido por punção da cisterna magna, semeadas em placas de ágar sangue de carneiro 5% e incubadas a temperatura de 37°C durante 24 horas (IRAZUZTA et al 2002; SURY et al., 2008).

3.6 Permeabilidade da barreira hemato-encefálica por Azul de Evans

A integridade da barreira hemato-encefálica foi investigada através de extravasamento do corante azul de Evans (SMITH et al., 1996). Foi injetado 1mL via i.p de azul de Evans (1%) 1h antes de serem mortos (COIMBRA et al, 2007). Os animais foram anestesiados, consistindo de uma administração intraperitoneal de cetamina (6,6 mg/kg), xilazina (0,3 mg/kg) e acepromazina (0,16 mg / kg) (HOOGMAN, 2007; GRANDGIRARD et al, 2007), o tórax foi aberto posteriormente, o cérebro foi perfundido com 200mL de solução salina através do ventrículo esquerdo na pressão de 100mmHg até que o fluido de perfusão incolor fosse obtido a partir do átrio direito. Assim, os animais foram sacrificados em diferentes tempos: 3, 6, 12, 18, 24, 30 h após a indução de meningite pneumocócica. As estruturas cerebrais hipocampo e córtex cerebral foram retiradas para avaliação da BHE. As amostras foram pesadas e colocadas em 50% de solução tricloroacético. Após homogeneização e centrifugação, o corante extraído foi diluído com etanol (1:3), e foi determinada a sua fluorescência (excitação em 620nm e emissão a 680nm) com um espectrofotômetro de luminescência (Hitachi 650-40, Tóquio, Japão). Os cálculos foram baseados no padrão externo (62,5-500ng / mL) no mesmo solvente. O teor de

azul de Evans no tecido foi quantificado a partir de uma linha padrão linear derivada de quantidades conhecidas do corante e expressa por grama de tecido (SMITH, et al., 1996). Após a retirada das estruturas, os animais foram acomodados em saco branco leitoso, sendo transportado por empresa contratada pela universidade, para descarte como resíduo infectante.

3.7 Análises estatísticas

As variáveis foram apresentadas em média \pm S.E.M. de 5-6 animais em cada grupo. Diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância (ANOVA), seguido de Student-Newman-Keuls post hoc. $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4 RESULTADOS

A mortalidade dos animais no grupo sham foi 16,6% e 47,3% no grupo de meningite. No córtex dos animais neonatos, figura 03, observou-se o rompimento da BHE às 12h, e permaneceu até as 24 horas após a indução. No hipocampo o rompimento da BHE ocorreu as 12h pomenecendo até 18 horas após a indução da meningite.

4.1 Hipocampo e córtex de ratos infantis

Conforme a figura 06, o rompimento da BHE com meningite pneumoniae foi identificada em três tempos, ocorrendo as 12, 18 e 24 horas apoós a indução.

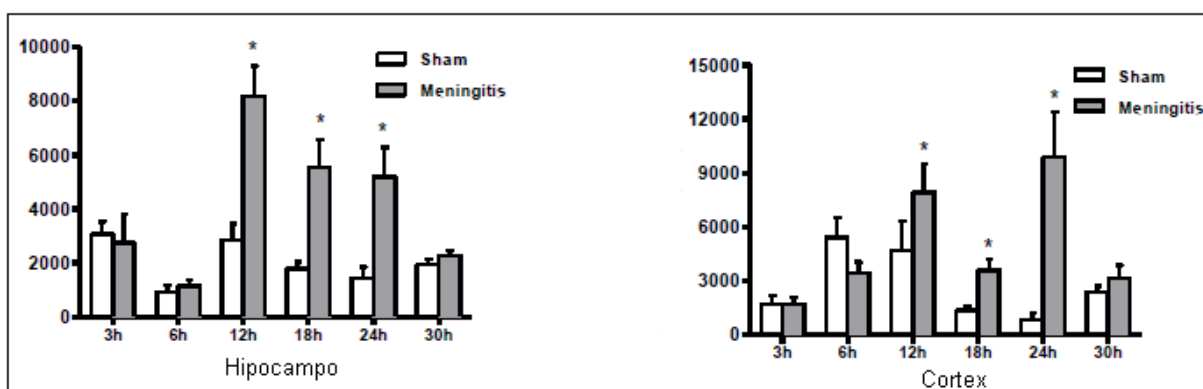


Figura 05: Hipocampo e córtex de ratos infantis. Os resultados mostram a média \pm S.E.M. de 5 animais em cada grupo. Os símbolos indicam estatisticamente significativa quando comparados ao grupo sham * $p < 0,05$.

A integridade da BHE foi investigada através de extravasamento do corante azul de Evan no hipocampo e no córtex, após a indução de meningite por *S. pneumoniae*. Figura 5A, hipocampo e 5B, córtex, mostram que o extravasamento foi obtido em varios tempos, aos 3, 6, 12, 18, 24 e 30 h após a indução da meningite. A integridade da BHE foi avaliada por fluorescência e determinada (excitação em 620 nm e emissão a 680 nm) com um espectrofotômetro de luminescência e os resultados são mostrados como ng / mg de tecido. Os resultados mostram a média \pm S.E.M. de 5 animais em cada grupo. Os símbolos indicam estatisticamente significativa quando comparados ao grupo sham * $p < 0,05$.

4.2 Hipocampo e córtex de ratos neonatos

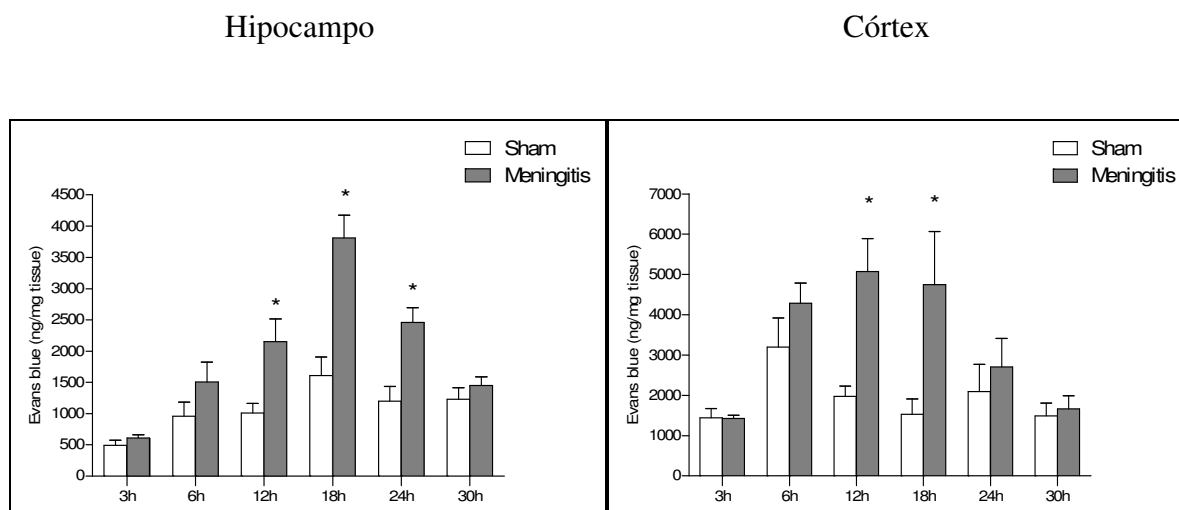


Figura 06: Hipocampo e córtex de ratos neonatos. Os resultados mostram a média \pm S.E.M. de 5 animais em cada grupo. Os símbolos indicam estatisticamente significativa quando comparados ao grupo sham * $p < 0,05$.

A integridade da BHE foi investigada através de extravasamento do corante azul de Evan no hipocampo e no córtex, após a indução de meningite por *S. pneumoniae*. Figura 5A, hipocampo e 5B, córtex mostram que o extravasamento foi obtido em varios tempos, aos 3, 6, 12, 18, 24 e 30 h após a indução da meningite. A integridade da BHE foi avaliada por fluorescência foi determinada (excitação em 620 nm e emissão a 680 nm) com um espectrofotômetro e luminescência e os resultados são mostrados como ng / mg de tecido. Os resultados mostram a média \pm S.E.M. de 5 animais em cada grupo. Os símbolos indicam estatisticamente significativa quando comparados ao grupo sham * $p < 0,05$.

4.3 Discussão

A invasão bacteriana das meninges induz uma resposta imune complexa (COIMBRA *et al*, 2006). As células da glia, células endoteliais e macrófagos podem produzir citocinas e outras moléculas pro-inflamatórias em resposta ao microorganismo *S. pneumoniae* e suas grandes quantidades de componentes

subcapsular que são liberadas, que incluem lipopolissacarídeo, ácido lipoteicóico, pneumolisina e DNA bacteriano (HIRST *et al*, 2004).

As citocinas podem ativar membros das Src-família cinases (SFKs) que participam no regulamento da disfunção associado à inflamação endotelial da BHE (NWARIAKU *et al*, 2002). A produção de citocinas no cérebro foi acompanhada pela fosfotirosina elevada em vasos sanguíneos in vivo (BOLTON *et al*, 1998). A BHE foi danificada entre 12 e 24 horas após a indução da meningite *S. pneumoniae*.

de Vries e colaboradores (1996) demonstram in vitro, que as citocinas indiziram a quebra da BHE cultura, de células bovinas indicando que todas as citocinas ativam as células endoteliais cerebrais para produzir eicosanóides, que posteriormente induzirão a quebra da BHE. Algumas metaloproteinases (MMPs) são induzidas por várias citocinas e quimiocinas (BIDDISON *et al*, 1997 e LEPPERT *et al*, 2001). As MMPs parecem desempenhar um papel central no desenvolvimento de meningite bacteriana, a quebra da BHE e a produção intratecal de citocinas e o acúmulo de leucócitos derivados do sangue (LEIB, *et al*, 2000). No modelo de meningite utilizado ratos, o tratamento com inibidor das MMP atenuou no rompimento da BHE na diminuição da pressão intracraniana (PAUL *et al*, 1998). A quebra aguda da BHE, a produção de citocinas e acúmulo de leucócitos são eventos chave no desenvolvimento de doenças que levam a edema cerebral e lesões neuronal na meningite bacteriana (LEIB; TAUBER, 1999).

CONCLUSÃO

Concluimos que o tempo em que observamos a quebra da BHE está associada com os níveis de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias durante a meningite. Nossos resultados sugerem que os ratos jovens, são capazes de criar um ambiente inflamatórias com a produção das citocinas e quimiocinas, e o com o dano causado pela meningite muitas crianças apresentam sequelas severas ou moderadamente severas a meningite ainda se mantém como uma das patologia mais preocupantes do nosso meio tem um rápido diagnostico e tratamento eficaz desde que haja precocidade na investigação e esta não seja atrasada pelo uso de inadequado de antibiótico.

REFERÊNCIAS

- BIDDISON; W.E. Biddison, D.D. Taub, W.W. Cruikshank, D.M. Center, E.W. Connor e k. Honma. **Quemoquina e matriz de secreção metaloproteinase por células de T CD8 + mielina Proteolipídica proteínas específicas: potenciais funções na inflamação.** Immunol, 1997.
- BOLTON et al, 1998. S.J. Bolton, D.C. Anthony e V.H. Perry. **Perda de proteínas de junção apertada occludin e zonula occludens-1 do endotélio vascular cerebral durante induzida por neutrófilos barreira hemato - encefálica breakdown in vivo.** Neurociência, 1998.
- BRASIL, Ministério da Saúde. **Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde.** Brasília: Ministério da Saúde, 6. ed., 2005. 816 p.
- BRAUN, J. S. et al. Pneumolysin Causes Neuronal Cell Death through Mitochondrial Damage. **Infection and Immunity**, v. 75, 2007.
- BURT, A. M. **Neuroanatomia.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995.
- COIMBRA et al., 2006 R.S. Coimbra, v. Voisin, A.B. de Saizieu, R.L. Lindberg, m. Wittwer, m. Leppert e S.L. Leib. **Expressão gênica no córtex e hipocampo durante a meningite pneumocócica aguda.** BMC Biol. 2006.
- _____. 2007 R.S. Coimbra, g. Loquet e S.L. Leib. **Limited eficácia da terapia adjuvante com dexametasona na prevenção da perda auditiva devido a meningite pneumocócica experimental no rato infantil.** Pediatr. Res. 2007.
- DAVIS, L. E.; GREENLEE, J. E. **Pneumococcal meningitis:** antibiotics essential but insufficient. New York: Oxford University Press. v. 126, 2003.
- de VRIES et al, 1996. H.e. de Vries, M.C.M. Blom-Rosemalen, m. van Oosten, A.G. de Boer, T.J.C. van Berkl, D.D. Breimer e j. Kuiper. **A influência de citocinas na integridade da barreira hemato - encefálica in vitro.** j. Neuroimmunol. 1996.
- GIL-SETAS et al. Antibiotic sensitivity and treatment recommendations for *Streptococcus pneumoniae*. **An. Sist. Sanit. Navar.** v. 27, 2004.
- GRANDGIRARD, D. et al. An infant mouse model of brain damage in pneumococcal meningitis. **Acta Neuropathologica**, v.114, p.609-617, 2007.
- HARRISON, T. R.; BRAUNWALD, E. **Medicina interna.** 16. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2006.
- HIRST et al, 2004. R.a. Hirst, r. Kadioglu, o c. '.: Callaghan Dispose e P.W. Andrew. **O papel de pneumolysin em pneumonia pneumocócica e meningite.** Clin. Exp. Immunol. 2004.

HOOGMAN et al., 2007 M. Hoogman, m. van Beek de, m. Weisfelt, j. Gans e b. Schmand. **Resultado cognitivo em adultos depois de meningite bacteriana.** j. Neurol. Neurosurg. Psiquiatria, 2007.

IRAZUZTA et al. Modulation of nuclear factor-KB activation and decreased markers of neurological injury associated with hypothermic therapy in experimental bacterial meningitis. **Crit Care Med.** v. 30, 2002.

_____. Dexamethasone decreases neurological sequelae and caspase activity. **Intensive Care Med.** v. 31, 2005.

LEIB, 1999 S.L. Leib e M.G. Tauber. **Patogênese de meningite bacteriana.** Infect. Dis. Clin. Norte Alt. 1999.

_____, 2000 S.L. Leib, m. Leepert, j. Clements e M.G. Tauber. **Matrix metaloproteínas contribuem para danos cerebrais na meningite pneumocócica experimental.** Infect. Immun. 2000.

LEPPERT et al, 2001. D. Leppert, R.L. Lindberg, I. Kappos e S.L. Leib. **Matrix metaloproteínas: operadores de terminais multifuncionais de inflamação em vários meningite esclerose e bacterianas.** Brain res. Brain res. Rev. 2001.

KIM, K. S. Mechanisms of microbial traversal of the blood-brain barrier. **Nature Reviews**, v.6, 2008.

KONEMAN, E. W. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido.** 6.ed. São Paulo: MEDSI, 2008.

LENT, Roberto. **Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociência.** São Paulo: Atheneu, 2005.

_____. **Neurociência da mente e do comportamento.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

LEVINSON, W.; JAWETZ, E. **Microbiologia médica e imunologia.** 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

MACHADO, A. B. M.; CAMPOS, G. B. **Neuroanatomia funcional.** 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2004.

MELI, D. N. et al. Current concepts in the pathogenesis of meningitis caused by Streptococcus pneumoniae. **Current opinion in Infectious Diseases**, v. 15, 2002.

MILLER, James R.; JUBLET, Burk. **Infecções Bacterianas: Tratado de Neurologia.** 10ª ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2002.

NWARIAKU et al., 2002 F.E. Nwariaku, z. Liu, x. Zhu, R.H. Turnage, G.A. Sarosi e L.S. Terada, **tirosina fosforilação de vascular endotelial caderina e o Regulamento de permeabilidade microvascular.** Cirurgia, 2002.

PAUL et al, 1998. R. Paul, s. Lorenzl, u. Koedel, b. Sporer, u. Vogel, m. Frosch e H.W. Pfister. **Matrix metaloproteinases contribuem para a barreira hemato - encefálica de interrupção durante a meningite bacteriana.** Neurol. Ann. 1998.

PRADO, F. C. do; VALLE, J. R. do; RAMOS, J. de A. **Atualização terapêutica: manual prático de diagnóstico e tratamento.** 21. ed. São Paulo: Artmed, 2003.

SILVA, C. H. P. de M. e. **Bacteriologia: um texto ilustrado.** Teresópolis, RJ: Eventos, 1999. 531 p.

SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia humana: uma abordagem integrada.** 2. ed. Barueri, SP: Manole, 2003.

SMITH , 1996 S.L. Smith e E.D. Hall. **Hipotermia leve de pré e posttraumatic atenua a barreira hemato - encefálica danos seguinte controlado prejuízo cortical impacto no rato.** J. Neurotrauma. 1996.

SOMAND, D.; MEURER, W. Central Nervous System Infections. **Emergency Medicine Clinics of North America**, v. 27,2009.

SURY M.D. et al. JNK is activated but does not mediate hippocampal neuronal apoptosis in experimental neonatal pneumococcal meningitis. **Neurobiology of Disease**, v. 32, p.142-150, 2008.

TORTORA, G. J. **Corpo humano: fundamentos de anatomia e fisiologia.** 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.

_____. **Fisiologia Humana.** 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 1988.

VERONESI, Ricardo; FOCACCIA, Roberto. **Meningites Bacterianas: Tratado de Infectologia.** 3 ed. São Paulo. Atheneu, 2005.